

Incidence du génotype du gène du récepteur à la ryanodine (Ryr1) associé à la sensibilité au stress dans 5 filières porcines belges

CHINA B., LEROY B., DAMS L., CLINQUART A., DAUBE G.

Université de Liège, Faculté de Médecine vétérinaire, Département des Sciences des Denrées alimentaires, Sart Tilman B43bis 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Dr. Bernard China Tél: 00 32 (0)4/366 40 17 Fax: 0032 (0)4/366 40 16 Email: bchina@ulg.ac.be

RÉSUMÉ

Le syndrome de stress chez le porc est dû à une mutation ponctuelle au niveau du gène Ryr1 codant pour le récepteur à la ryanodine. Ce syndrome se manifeste par une mortalité suite à des conditions de stress ou par une viande de mauvaise qualité. Nous avons détecté le génotype de cette mutation chez 505 individus pris dans 5 filières porcines belges. Ce génotypage a été réalisé par *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) ou par PCR en temps réel. Les résultats indiquent que 22,4 % des porcs sont sensibles au stress (génotype TT) et que 77,6 % des porcs sont résistants (63,4 % de génotype hétérozygote CT et 14,2 % de génotype CC). Une étude statistique permet de séparer les filières en deux groupes : les filières 1 et 2 présentent un taux élevé en individus TT (44 % et 52 % respectivement) alors que les filières 3, 4 et 5 présentent un taux élevé d'individus hétérozygotes (74 %, 92 % et 72 % respectivement).

D'un point de vue technique, la PCR en temps réel s'est révélée être une technique de choix par sa rapidité et sa facilité de mise en œuvre par rapport à la PCR-RFLP.

1. Introduction

La génétique du stress chez le porc est dominée par le syndrome de stress aigu, aussi connu comme le syndrome de stress porcin (*Porcine Stress Syndrom* ou PSS) ou l'hyperthermie maligne. PSS est caractérisé, chez les individus sensibles, par des contractures intenses des muscles squelettiques avec de l'acidose métabolique et une élévation de la température corporelle suivie fréquemment d'une mort rapide (Britt, 1991). Ce syndrome est provoqué par des stimuli de stress variés, comme la manipulation et le transport mais également l'inhalation d'anesthésiques comme l'halothane. Les pertes économiques majeures ne résident pas seulement des morts subites dans les situations de stress, mais aussi dans l'apparition de viande PSE (*Pale Soft Exudative*) qui est une manifestation *post mortem* de ce syndrome, expli-

quée par une diminution trop rapide du pH du muscle, surtout associé à une hyperthermie. Après l'abattage de tout animal, le métabolisme musculaire est profondément modifié. L'acide lactique provenant de la glycolyse s'accumule dans le tissu musculaire. Il s'ensuit une acidification progressive du muscle, traduite par la diminution du pH jusqu'à une valeur ultime de 5,5 à 5,8. L'amplitude et la vitesse de chute du pH déterminent de façon importante les qualités organoleptiques et technologiques de la viande. Le stress peut modifier ce processus *post mortem* et générer l'apparition de viandes « pisseuses » ou PSE. Ces viandes sont de couleur pâle, molles et humides. Un pH inférieur à 5,6, mesuré dans l'heure qui suit l'abattage, est un indicateur de la viande PSE (Sellier, 1998). Une viande PSE est très difficilement valo-

risable, ce qui entraîne des pertes économiques lors de sa commercialisation sous forme fraîche ou lors de sa transformation.

La fréquence des animaux susceptibles au stress varie en fonction des races. L'incidence des phénotypes PSS et PSE est plus importante dans les races exprimant une masse musculaire importante. Le locus RYR1 est d'ailleurs mis en relation avec des rendements à l'abattage et des pourcentages en viande plus élevés. Ainsi, l'incidence PSS et PSE est la plus élevée chez le Piétrain et est également, fréquente chez le Yorkshire, le Poland China, le Duroc et le Landrace. La susceptibilité au stress est liée aux mouvements des ions calcium dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. L'ouverture du canal est facilitée et la fermeture est inhibée.

Jadis, la sélection des animaux homozygotes sensibles était basée sur leur réponse au test halothane (Allen *et al.*, 1970). Le syndrome PSS peut être provoqué par une exposition courte au gaz halothane, un agent anesthésique. Les animaux récupèrent si l'administration du gaz est arrêtée dès l'apparition des premiers symptômes. Les études basées sur la réactivité à l'halothane montrèrent le caractère récessif de la transmission (Ollivier *et al.*, 1975). Le locus responsable fut baptisé HAL (Andresen et Jensen, 1977), avec deux allèles N (normal, dominant), n (sensible, récessif) (Sellier, 1998). Les porcs halothane positifs ont des carcasses plus lourdes, plus courtes et plus maigres que les porcs Halothane Négatifs. La sensibilité à l'halothane induit une accélération de la chute du pH musculaire *post mortem*.

Dans un premier temps, nous avons détecté la mutation dans le gène Ryr1 par « *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* » (PCR-RFLP) chez 505 porcs provenant de 5 filières différentes. La PCR-RFLP est une technique fastidieuse, c'est pourquoi, dans un second temps, nous avons validé une nouvelle méthode de détection de la mutation liée au stress porcin par PCR en temps réel.

1.1. Echantillons

Dix milligrammes de tissus sont utilisés pour extraire l'ADN génomique (Wizard SV genomic kit, Promega). La concentration de la solution d'ADN est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

En partant de la séquence du gène Ryr1 (code d'accèsion dans Genbank X68247) et en utilisant le logiciel oligo6 (Medprobe), les amorces oligonucléotidiques suivantes furent sélectionnées: Ryr1576: cgcaagtgccttcacacc et Ryr1814: cattcaccggagtggagtct (figure 1). Le mélange de PCR (20 µl) fut le suivant : 2 µl de tampon 10 X (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl, pH 9), 2 µl de dNTPs 2mM, 2 µl d'ADN (10 à 100 ng), 0,2 µl de Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences), 0,2 µl de chaque amorce (40 pmol ml⁻¹) et 13,2 µl d'eau ultrapure. Les conditions suivantes d'amplification furent appliquées : 1X (94°C pendant 5 min), 40 X (94°C

162

30 sec., 58°C 30 sec., 72°C 60 sec.), 1 X (72°C pendant 4 min), dans un thermocycleur (Mastercycler gradient Eppendorf). Le fragment de 258 paires de bases (pb) fut ensuite soumis à une restriction enzymatique. Dix microlitres du produit de PCR ont été digérés par une unité d' *Hin6I* (GCG ↓C) ou une unité d' *Alw21I* (GWGCW ↓C) en suivant les recommandations du fabricant (MBI Fermentas). L'enzyme *Hin6I* clive l'ADN quand l'allèle C est présent et l'enzyme *Alw21I* coupe l'ADN quand l'allèle T est présent. La longueur des fragments de restriction générés était respectivement de 92 et 166 pb. La méthode décrite ci-dessus a été accréditée par Beltest (procédure P13/I501.1 du 13/09/2001).

1.3. Polymerase Chain Reaction en temps réel

Les amorces de PCR et les sondes ont été choisies en utilisant le logiciel Primer express (Applied Biosystems) : Ryr1-169F: gaccctaggtgctgcatg; Ryr1-295R: tgaggttgctgcaagcagaag; Ryr1-a: FAM-TGGAGCaCACGGC-NFQ-MGB; Ryr1-g: VIC-TGGAGCgCACGGC-NFQ-MGB (NFQ: *Non Fluorescent Quencher*; MGB: *minor groove binder*). La réaction de PCR en temps réel a été réalisée en utilisant le tampon du fournisseur (TaqMan master Mix 2X concentré, Applied Biosystems), des amorces de PCR (900 nM) et les sondes allèles-spécifiques (200 nM). Sur l'appareil de PCR en temps réel (ABI7000, Applied Biosystems), le protocole standard a été appliqué (1 X 50°C durant 2 min.; 1 X 95°C durant 10 min. et 40X (95°C 15 s, 60°C 1 min)).

1.4. Statistiques

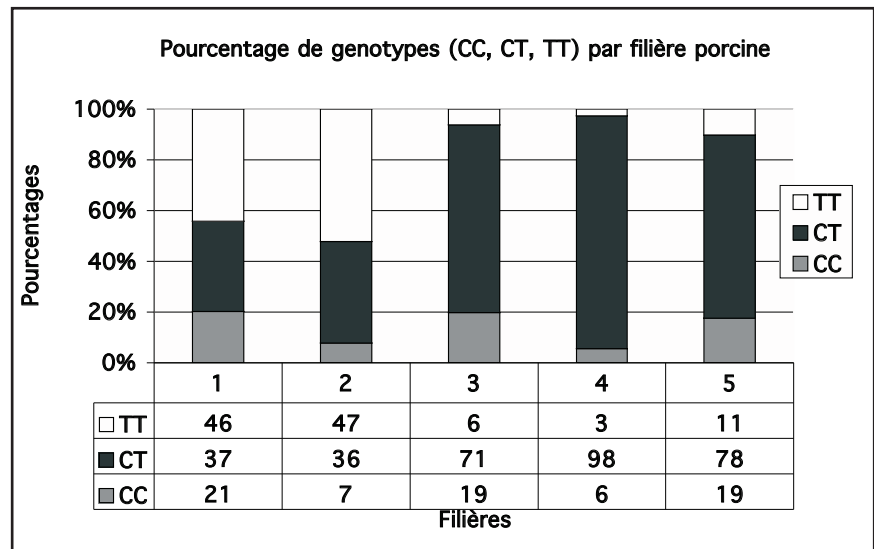
Les tests d'indépendance (table de contingence et calcul de χ^2) ont été réalisés grâce au logiciel InStat 2.01 (Graphpad Software).

III. RESULTATS

1.1. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

L'ADN génomique a été extrait à partir des tissus porcins, amplifié par PCR et analysé par restriction et électrophorèse. Les résultats obtenus pour les 505 individus sont résumés à la figure 2 en fon-

Figure 2. Répartition des génotypes par filière



La répartition des différents génotypes (CC, CT, TT) par filière (1 à 5) est représentée graphiquement en pourcentage et sous forme de tableau en valeurs absolues.

tion des différentes filières. Si on prend les résultats globalement, on obtient 22,4 % d'individus stress sensibles présentant le génotype homozygote TT et 77,6 % des individus résistants au stress, avec 63,4 % d'individus hétérozygotes CT et 14,2 % d'individus homozygotes CC. La fréquence génique de l'allèle C vaut : 45,9 %, la fréquence de l'allèle T : 54,1 %. Les fréquences génotypiques théoriques sont 21,07 % pour le génotype CC, 29,27 % pour le génotype TT et 49,66 % pour le génotype CT. Une analyse statistique ($\chi^2 = 3,93$) indique que l'équilibre d'Hardy-Weinberg est respecté ($P = 0,22$). Afin de savoir si la répartition des génotypes était identique pour les différentes filières, nous avons réalisé un test d'indépendance entre les génotypes et les filières. Celui-ci a montré que ces deux critères étaient liés ($\chi^2 = 145,33$; $P < 0,0001$). Il y a donc un effet de la filière sur la répartition des génotypes.

C'est pourquoi, nous avons poussé l'analyse en réalisant des tests d'indépendance entre les filières prises deux à deux. Les résultats indiquent que les filières 1 et 2 diffèrent peu

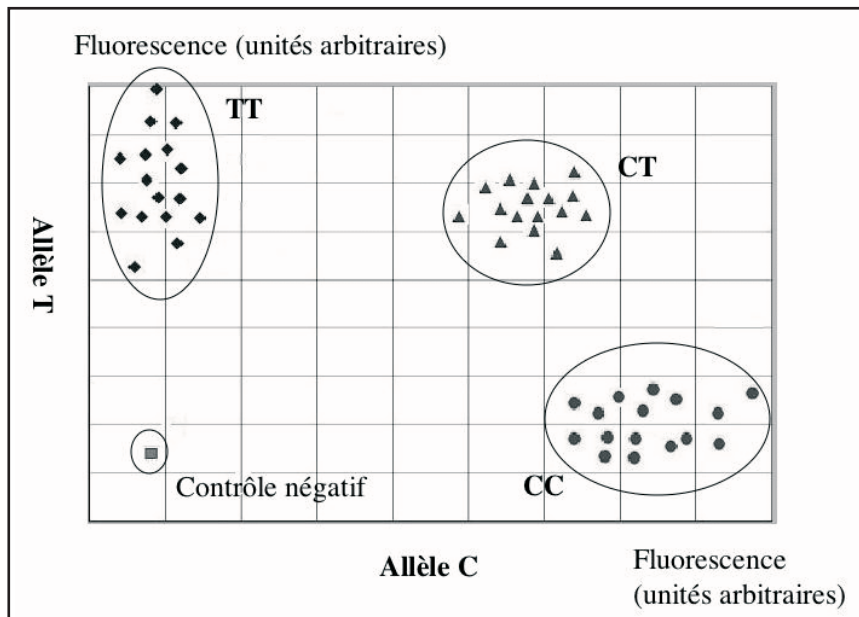
($\chi^2 = 6,045$; $P = 0,049$) c'est-à-dire qu'elles présentent des distributions de génotypes semblables alors que les filières 3, 4, 5 ne peuvent être distinguées quant à leur distribution génotypique. Par contre, la comparaison entre les filières 1 et 2 et les filières 3, 4 et 5 révèle une différence hautement significative ($\chi^2 = 16,2$; $P = 0,0028$). En effet, si on regarde les chiffres de la figure 3, on constate que les filières 1 et 2 présentaient un taux élevé (44 %

et 52 %, respectivement) d'individus arborant un génotype homozygote TT sensible au stress alors que les filières 3, 4 et 5 montraient surtout des individus stress résistants (74 %, 92 % et 78 % respectivement) présentant un génotype hétérozygote CT alors que la proportion d'individus sensibles au stress (TT) était faible (< 12 %). Au sein du groupe 3,4,5, les filières 3 et 5 sont les plus proches ($P > 0,5$) en ce qui concerne la fréquence des 3 génotypes.

1.2. Real Time Polymerase chain reaction

La technique de PCR-RFLP est longue et fastidieuse. Elle se prête assez mal à l'automatisation et au traitement de nombreux échantillons. C'est pourquoi un test de PCR en temps réel a été développé pour détecter la mutation liée au syndrome de stress chez le porc. Seize individus de chaque génotype (CC, CT et TT) déterminé par la technique de PCR-RFLP ont été sélectionnés. L'ADN de ces individus a été analysé par PCR en temps réel en utilisant une sonde spécifique de la mutation T et une sonde spécifique de la mutation C. Les résultats sont présentés à la figure 3. Nous avons établi qu'ils coïncident en tout point à ceux obtenus par PCR-RFLP. On en conclut que la technique de PCR en temps réel est une technique adéquate pour déterminer le génotype de la mutation liée au syndrome de stress chez le porc.

Figure 3. Discrimination allélique



Après amplification par PCR en temps réel, la fluorescence associée à chaque allèle (C ou T) est mesurée. Le graphique représente en abscisse la fluorescence associée à l'allèle C et en ordonnée la fluorescence associée à l'allèle T. Sur les 48 individus testés, trois populations se dégagent: les individus TT, les individus CC et les individus CT. ▲ : génotype CT, ◆ : génotype TT, ● : génotype CC, ■ : contrôle négatif.

IV. DISCUSSION

Le syndrome de stress chez le porc est responsable de morts subites et d'une mauvaise qualité de la viande (caractère PSE). Dès lors, il est important d'identifier les animaux sensibles au stress. Cette maladie est due à une mutation ponctuelle au niveau du gène Ryr1. Le phénotype de sensibilité au stress ne s'exprime que si le génotype de l'individu est homozygote TT.

Etant donné les conséquences négatives tant d'un point de vue sanitaire (mortalité aiguë) que d'un point de vue de la qualité technologique de la viande, il était intéressant de rendre compte du pourcentage de porcs sensibles ou résistants au stress dans notre échantillonnage de porcs.

Le génotype de 505 porcs appartenant à 5 filières belges a été déterminé. Les résultats mettent en évidence le fait qu'il existe encore actuellement un pourcentage élevé de porcs sensibles au stress, près de 22,4 % dans notre étude. De plus, des différences significatives ont été observées entre filières puisqu'au sein des filières 1 et 2, près de 50 % des porcs étaient sensibles au stress. De tels pourcentages peuvent sans doute s'expliquer par le fait que le porc Piétrain belge, naturellement sensible au stress, est souvent utilisé en croisement terminal du fait de sa conformation exceptionnelle et de son excellent rendement en

viande maigre. Afin d'augmenter la proportion de porcs « stress négatifs », il semble intéressant d'effectuer des croisements avec des lignées maternelles « stress négatif » (homozygotes). Enfin, l'utilisation du verrat Piétrain ReHal (résistance à l'halothane) est également intéressante en raison de sa résistance au stress et de ses grandes qualités de carcasse (Leroy *et al.*, 1999). D'autant plus que la nouvelle lignée créée après plusieurs croisements (Porc Fleuri) possède un pourcentage en muscle semblable à celui du porc Piétrain sensible au stress.

En outre, parmi les 77,4 % porc résistants au stress, la grande majorité (63,4%) sont des individus hétérozygotes (CT). Ce pourcentage est important à noter puisqu'en général les porcs hétérozygotes présentent des qualités de viande intermédiaires entre les porcs homozygotes sensibles au stress et les homozygotes résistants.

Si les résultats sont analysés d'un point de vue des filières, on constate que les filières 1 et 2 d'une part et les filières 3, 4 et 5 d'autre part, forment deux groupes distincts. Le premier groupe est caractérisé par une proportion importante d'individus présentant un génotype de sensibilité au stress (> 45 %) ce qui d'un point de vue du risque de pathologie et de la qualité de la viande est un réel problème. Par contre l'autre groupe présente un fai-

ble pourcentage d'individus sensibles au stress (< 12 %). De plus dans ce groupe se trouve la filière 3 qui s'est engagée dans son cahier de charge à garantir des individus stress résistants. Avec 6 % d'individus sensibles au stress (TT), ils remplissent correctement leur engagement. Cependant, les meilleurs résultats sont obtenus par la filière 4 avec seulement 3% d'individus sensibles au stress. Ceci est sans doute lié à la génétique des reproducteurs utilisés. Dans la filière 3, la génétique du Piétrain (sensible au stress) est très présente ce qui explique aussi le nombre important d'hétérozygotes (CT). Enfin, c'est la distribution de la filière 3 qui se rapproche le plus de la distribution de la population témoin (filière 5). Quoiqu'il en soit, cela ne remet pas en cause l'intérêt du cahier de charges dans les filières contrôlées dans la mesure où seul le critère de sensibilité au stress a été considéré dans cette étude.

Même si le gène de sensibilité à l'halothane est un des facteurs déterminants pour l'incidence du caractère PSE, une série d'autres mesures sont à préconiser afin de minimiser cette anomalie. L'instauration d'une période de repos avant l'abattage, le respect d'une mise à jeun, l'optimisation des techniques d'étourdissement et des conditions de transport en sont quelques exemples.

Quoiqu'il en soit, il est important de connaître le génotype des reproducteurs afin de déterminer le pourcentage d'animaux sensibles au stress. Pour cela, il est nécessaire de développer des techniques de génotypage performantes.

Deux techniques ont été utilisées pour détecter la mutation liée au stress chez le porc: d'une part la PCR-RFLP qui est la première décrite mais qui est longue (PCR, restriction, électrophorèse) et fastidieuse (manipulation de gels d'agarose avec coloration au bromure d'éthidium). La PCR en temps réel qui s'est développée plus récemment permet grâce à l'utilisation de sondes spécifiques de détecter des mutations ponctuelles (Germer *et al.*, 2000). Cette technique est rapide car la détection est simultanée à l'amplification, elle permet de traiter un grand nombre d'échantillons (96 à 384) en une analyse et la productivité journalière est aussi beaucoup plus élevée qu'en PCR-RFLP. Le problème majeur de la PCR en temps réel est le coût

de l'appareillage (> 30 000 euros) et des réactifs (15 euros le génotypage).

V. REMERCIEMENTS

Bernard China a été financé par une bourse First-Europe de la DGTRE (EP 1A320501R0092/9914330).

Cette étude s'inscrivait dans le cadre du projet « Etablissement d'outils de validation des cahiers des charges dans le cadre d'une certification de conformité de la viande de porc de qualité » arrêté ministériel du 2 avril 2001, arrêté ministériel du 23 Juillet 2002, financé par le ministère de la région wallonne direction générale de l'agriculture.

SUMMARY

Porcine stress syndrome is related to a point mutation in Ryr1 gene encoding the ryanodin receptor. This syndrome involves mortality after stress conditions or poor quality meat. Five hundred and five individuals among 5 Belgian production systems were genotyped. This genotyping was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) or real time PCR. The results indicated that 22,4 % of the pigs were stress

sensitive (TT genotype) and 77,6 % stress resistant (63,4 % CT heterozygotes and 14,2 % CC genotype). Statistical analysis allowed to split the production systems into two groups: the production system 1 and 2 presenting a high level of TT individuals (44 % and 52 % respectively) although production systems 3, 4 and 5 presented a high level of heterozygotes individuals (74 %, 92 % and 78 % respectively).

At the technical level, real time PCR appeared to be a faster and an easier technique than PCR-RFLP.

REFERENCES

- ALLEN W. M., PATTERSON D. S., HARDING J.D., BERRETT S. Experimentally induced acute stress syndrome in Pietrain pigs. *Vet. Rec.*, 1970, **87**, 64-69.
- ANDRESEN E., JENSEN P. Close linkage established between the HAL locus for halothane sensitivity and the PHI (phosphohexose isomerase) locus in pig of the Danish Landrace breed. *Nord. Vet. Med.*, 1977, **29**, 502-504.
- BRITT B.A. Malignant hyperthermia : a review. In : Schobaum E., Lomax P. (Eds.), *Thermoregulation : pathology, pharmacology and therapy*. Pergamon : New York, 1991, 179-292.
- CHINA B., GHAFIR Y., DAUBE G. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 99-109.
- DAVIES W., HARBITZ I., FRIES R., STRANZINGER G., HAUGE J. G. Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using a linked probe. *Anim. Genet.*, 1988, **19**, 203-212.
- FUJII J., OTSU K., ZORZATO F., DE LEON S., KHANNA V. K., WEILER J. E., O'BRIEN P. J., MACLENNAN D. H. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor identified with malignant hyperthermia. *Science*, 1991, **253**, 448-451.
- GERMER S., HOLLAND M. J., HIGUCHI R. High throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.*, 2000, **10**, 258-266.
- LEROY B., CLINQUART A. Etablissement d'outils de validation des cahiers des charges dans le cadre d'une certification de conformité de la viande de porc de qualité. Rapport d'activité n°1. Ministère de la Région wallonne Direction Générale Agriculture : Namur, 2001, 45p.
- LEROY P.L., VERLEYEN V., DETRY J-P. Le porc Piétrain résistant au stress (ReHal) dans la filière porcine. In : *Proceedings du 4ème Carrefour des productions animales de Gembloux*, 27/01/1999, Gembloux, 1999. Facultés Agronomiques de Gembloux: Gembloux, 1999, 39-40.
- MACKENZIE A.E., KORNELUK R.G., ZORZATO F., FUJII J., PHILLIPS M., ILES D., WIERINGA B., LEBLOND S., BAILLY J., WILLARD H.F. The human ryanodine receptor gene: its mapping to 19q13.1, placement in a chromosome 19 linkage group, and exclusion as the gene causing myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, **46**, 1082-1089.
- MACLENNAN D. H., DUFF C., ZORZATO F., FUJII J., PHILLIPS M., KORNELUK R. G., FRODIS W., BRITT B. A., WORTON R. G. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*, 1990, **343**, 559-561.
- NAKAJIMA E., MATSUMOTO T., YAMADA R., KAWAKAMI K., TAKEDA K., OHNISHI A., KOMATSU M. Use of a PCR-Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) for the detection of a point mutation in the swine ryanodine receptor (Ryr1) gene. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 2904-2906.
- OLLIVIER L., SELLIER P., MONIN G. Déterminisme génétique du syndrome d'hyperthermie maligne chez le porc Piétrain. *Ann. Génét. Select. Anim.*, 1975, **7**, 159-166.
- OTSU K., PHILLIPS M. S., KHANNA V. K., DE LEON S., MACLENNAN D. H. Refinement of the diagnostic assays for a probable causal mutation for porcine and malignant hyperthermia. *Genomics*, 1992, **13**, 835-837.
- REMPEL W. E., LU M., EL KANDELGY S., KENNEDY C.F., IRVIN L. R., MICKELSON J. R., LOUIS C. F. Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene for porcine stress syndrome. *J. Anim. Sci.*, 1993, **71**, 1395-1399.
- SELLIER P. Genetics of meat and carcass traits. In : Rothschild M. F., Ruvinsky A. (Eds), *the genetics of the pig*. CAB international : Wallingford, 1998, 463-510.